

曾臻, 倪健斌, 史博, 等. 3β -HSD 基因在福建牡蛎性类固醇激素合成机制中的表达研究[J]. 渔业研究 2019 41(2): 87–95.

3β -HSD 基因在福建牡蛎性类固醇激素合成机制中的表达研究

曾臻^{1,2}, 倪健斌², 史博², 谭强来^{1,2*}

(1. 厦门医学院, 福建 厦门 361023;

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 3β -羟化类固醇脱氢酶 (3β -HSD) 能够催化生成不同类型的类固醇激素, 而关于贝类中类固醇激素合成相关酶的基因信息十分有限。本实验利用分子克隆的方法获得了福建牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 性类固醇激素合成相关酶基因 3β -HSD 的全长序列, 总长为 1 444 bp, 编码 356 个氨基酸。利用 qRT-PCR 和原位杂交技术检测了该基因在福建牡蛎中的时空表达特征, 该基因在牡蛎大多数组织 (外套膜、鳃、性腺、闭壳肌和内脏团) 中均有表达, 但在性腺中表达量最高 ($P < 0.05$)。原位杂交结果显示该基因表达在卵巢里富有分泌作用的滤泡细胞中。本文讨论了 3β -HSD 在牡蛎性类固醇激素合成过程中的作用, 为阐明牡蛎具有内源性类固醇激素的合成能力奠定基础, 为进一步研究牡蛎生殖内分泌机理提供参考。

关键词: 福建牡蛎; 3β -HSD 基因; 生殖; 内分泌

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2019)02-0087-09

福建牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 是我国南方贝类养殖的主要种类, 近年来其商业价值不断增加, 对福建牡蛎生殖调控的研究在养殖中具有重要的应用价值^[1]。此外, 牡蛎是分析河口污染情况的环境指示种, 养殖环境中大量的污染物可以通过扰乱牡蛎的内分泌调节影响牡蛎的生理活动, 因此对牡蛎内分泌机制的研究显得尤为重要。然而目前国内外有关贝类生殖内分泌的研究却十分有限。

类固醇激素 (Steroid hormone) 是最主要的一类性腺激素, 包括雄激素、雌激素和孕酮等。

目前, 在包括头足纲、双壳纲和腹足纲在内的不少软体动物组织中均检测到类似脊椎动物性类固醇激素物质的存在^[2-3]。研究发现这些性类固醇激素参与了贝类的生殖调控, 在贝类的性腺发育过程中发挥着重要作用。然而, 关于类固醇激素在贝类中是如何发挥作用的机制还不甚清楚。Wang 等^[4]用放射性配体结合实验的方法在海扇贝 (*Placopecten magellanicus*) 性腺组织中检测到 2 个雌激素结合位点, 竞争性结合实验进一步证明这两个结合位点具有特异性结合雌激素的能力, 并且这种作用在配子发生的早期更加明显。

收稿日期: 2019-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31702314); 厦门市科技计划项目 (3502Z20154077); 福建省中青年骨干教师教育科研项目 (JAT160585); 厦门医学院自然科学研究项目 (K2015-07、K2015-09)。

作者简介: 曾臻 (1985-), 女, 福建漳州, 讲师, 博士, 从事贝类功能基因及生殖发育研究。

Tel: 13696992129. E-mail: zengzhen@xmmc.edu.cn

通讯作者: 谭强来 (1988-), 男, 江西丰城, 讲师, 博士, 从事益生菌及海洋功能食品研究。

Tel: 15880210717. E-mail: tanqianglai@xmmc.edu.cn

另外，Wang 等^[5-6]还发现用脊椎动物类固醇激素受体拮抗剂（如 1.25 μM 它莫西芬、2.5 μM 氟他胺、1.00 μM 美服培酮）可以阻断类固醇激素在海扇贝中的生物学作用。这些研究结果表明在贝类中可能同样存在由雌激素介导的生殖调节机制，并且可能是通过激活其受体来发挥作用的。

研究发现，贝类中类固醇激素合成的底物与脊椎动物同样是胆固醇和孕烯醇酮^[7-8]。但目前有关贝类中类固醇激素合成和代谢机制的研究较少，而且比较零散。其中 3β -羟化类固醇脱氢酶（ 3β -Hydroxysteroid dehydrogenases, 3β -HSDs）为类固醇激素合成代谢通路中的一种关键酶。 3β -HSD 可以催化孕烯醇酮或脱氢表雄酮生成有活性的孕酮和雄烯二酮。研究者在蜗牛（*Helix pomatia* L.）^[9]、真蛸（*Octopus vulgaris*）^[10]、紫贻贝（*Mytilus edulis*）^[11]和海蛞蝓（*Ariolimax californicus*）^[12]等软体动物的性腺组织提取物中也检测到了 3β -HSD 的这种活性。此外，Krusch 等^[9]还发现蜗牛卵巢中 3β -HSD 在产卵前的活性明显高于排卵后，这预示了其在蜗牛生殖活动中的重要功能。

本研究拟通过对福建牡蛎性类固醇激素合成相关酶 3β -HSD 的基因进行结构和功能探究，分析其时空表达特征，以及在牡蛎细胞中的定位，为阐明牡蛎内源性类固醇激素的合成机制奠定基础，为进一步研究牡蛎生殖内分泌机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用福建牡蛎购自福建省漳州市斗美村渔排，重量为 3.8 ~ 14.0 g/只。参考 Foighil 等^[13]和 Folmer 等^[14]的方法，根据线粒体 COI 基因片段序列特征进行种的鉴定，确定所采样品为福建牡蛎。根据形态学观察^[15]，将所采样品分为四个阶段：增殖期、生长期、繁殖期和排放期，每个时期选取 15 只雄性和 15 只雌性作为本研究的实验对象。打开牡蛎壳后，取每个时期牡蛎不同组织（性腺、闭壳肌、外套膜、鳃、内脏团）放入液氮中速冻后保存于 -80℃ 冰箱中备用，同时取一小块成熟期性腺组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中（4℃ 固定过夜）。

1.2 RNA 提取

分别将样品置于 Trizol[®] Reagent（Invitrogen，USA）匀浆。按照 Trizol 使用说明书，分别从牡蛎不同组织提取总 RNA，通过 1% 变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，结合 Nanodrop ND-2000 分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。

1.3 3β -HSD 基因 cDNA 全长序列的克隆

根据反转录试剂盒（TIANGEN，China）步骤分别对所得的 RNA 进行反转录以获得 cDNA。基于本实验室构建的福建牡蛎转录组文库中筛选获得的 3β -HSD 基因的序列片段，按照 Full-RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒（TAKARA，China）要求，分别设计并合成 5' 和 3' RACE 特异性引物（引物序列见表 1），按照试剂盒说明书对福建牡蛎 3β -HSD 基因进行 5' 和 3' RACE 扩增，将所得序列产物进行纯化，并送至广州英韦创津（Invitrogen）生物技术公司进行测序分析。

表 1 实验所用引物序列

Tab. 1 The primers for study

序号 Number	引物名称 Primer name	实验用途 Purpose	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
1	3β -HSD-5'-outer	5'-RACE	CTGAATAGACTGTGGGGG
2	3β -HSD-5'-inner	5'-RACE	CAACATACAAAGCCCCAG
3	3β -HSD-3'-outer	3'-RACE	GGGTCCAGATGACCTCCTA
4	3β -HSD-3'-inner	3'-RACE	CCTCCTATTATGTGCCCTGTG
5	EF1 α -rt-f	qRT-PCR	ACCACCCTGCTGAGATCAAG
6	EF1 α -rt-r	qRT-PCR	ACGACGATCGCATTTCTCTT
7	3β -HSD-rt-f	qRT-PCR	GTGCCCATCCTGATCTACTG
8	3β -HSD-rt-r	qRT-PCR	GAAGTGGACGGACATCTTTG
9	3β -HSD-ish-f	原位杂交	CAGGGAGGCAGTGAAACAGAA
10	3β -HSD-ish-r	原位杂交	ATACAAAGCCCCAGGCAACA

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

根据 Quanta cDNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN, China) 的说明书, 以 $2\ \mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, Oligo-dT₁₅ 为引物, 通过 Quanta 反转录酶合成 cDNA 第一条链。以 cDNA 第一条链为模板, 以牡蛎 *Elongation factor 1 α* 基因 (*EF1 α* , GenBank accession No. BQ426516) 作为内参基因^[16], 同时预实验也证明该内参基因在福建牡蛎不同组织及不同性腺发育阶段的表达量十分稳定 (表 1)。运用 SYBR Green I 染料法在 ABI 7500 fast system real-time PCR 系统 (Applied biosystems, USA) 上定量分析不同时期牡蛎 3β -HSD 基因的 mRNA 表达变化。每个实验组设置 5 个平行样, 每个样品设置 3 个重复孔。每轮反应均设有 cDNA 实验组、阴性对照组 (用 DNase I 处理过, 但没有进行反转录的 RNA) 和空白对照组 (PCR 水)。通过系列梯度稀释样品构建标准曲线法, 计算本次 qRT-PCR 中所用引物的扩增效率 E 范围均处在 $95\% \sim 100\%$ ($R^2 > 0.99$) (表 1)。qRT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测均为 150 bp 大小的单一产物。本实验所使用的试剂盒为 SYBR Green qPCR Kit (Thermo, USA), 反应条件如下: 预变性 95°C 10 min; 95°C 20 s, 52°C 20 s, 72°C 20 s, 35 个循环。反应结束后对每个基因的熔解曲线进行分析。

所得数据用 ABI 7500 system SDS 软件 (Version 1.4, Applied biosystems) 进行分析, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法 ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{caVg}} - \text{Ct}_{\text{EF1}\alpha}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{实验组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{校准组}}$) 计算目的基因的相对表达量^[17-18]。

1.5 原位杂交

根据获得的 3β -HSD 基因序列, 设计杂交探针的引物 (表 1), 参考 Ni 等^[19] 的方法对 1.1 中固定于 4% 多聚甲醛溶液中 (4°C 固定过夜) 的成熟性腺组织进行原位杂交。

1.6 目的基因的生物信息学分析

用 BLAST 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源性比对; 用 DNA-

MAN 软件进行比对拼接, 得到基因的全长序列; 用 Compute pI/Mw tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测等电点和分子量; 用 SignalP 3.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 寻找信号肽; 用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜结构域; 用 Predict Protein 软件 (<http://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白质功能结构域; 用 CLUSTALX 软件进行多重序列比对; 用 MEGA 4.0 软件中的邻接法 (1000 bootstrap replicates) 构建系统进化树。

2 结果

2.1 福建牡蛎 3β -HSD 基因的序列全长及特征

如图 1, 福建牡蛎 3β -HSD 基因 (*ca3 β -HSD*) cDNA 序列全长 1 444 bp, 5'-UTR (5'-Untranslated region) 长 165 bp, 3'-UTR 长 210 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长 1 068 bp。该基因可编码 356 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 39.796 kDa, 等电点为 8.32。经 SignalP 和 TMHMM 软件预测可知 *ca3 β -HSD* 的氨基酸序列在 AA274 ~ AA296 存在 1 个跨膜结构。*ca3 β -HSD* 的氨基酸序列含有 3β -HSD 保守的结构域 (AA3 ~ AA348), 该结构域包括了 1 个酶活性中心 YGGTE (AA149 ~ AA153) 和 1 个辅酶结合位点 TGGAGFLG (AA7 ~ AA14), 其中 YGGTE 结构是短链脱氢酶保守的结构特征。

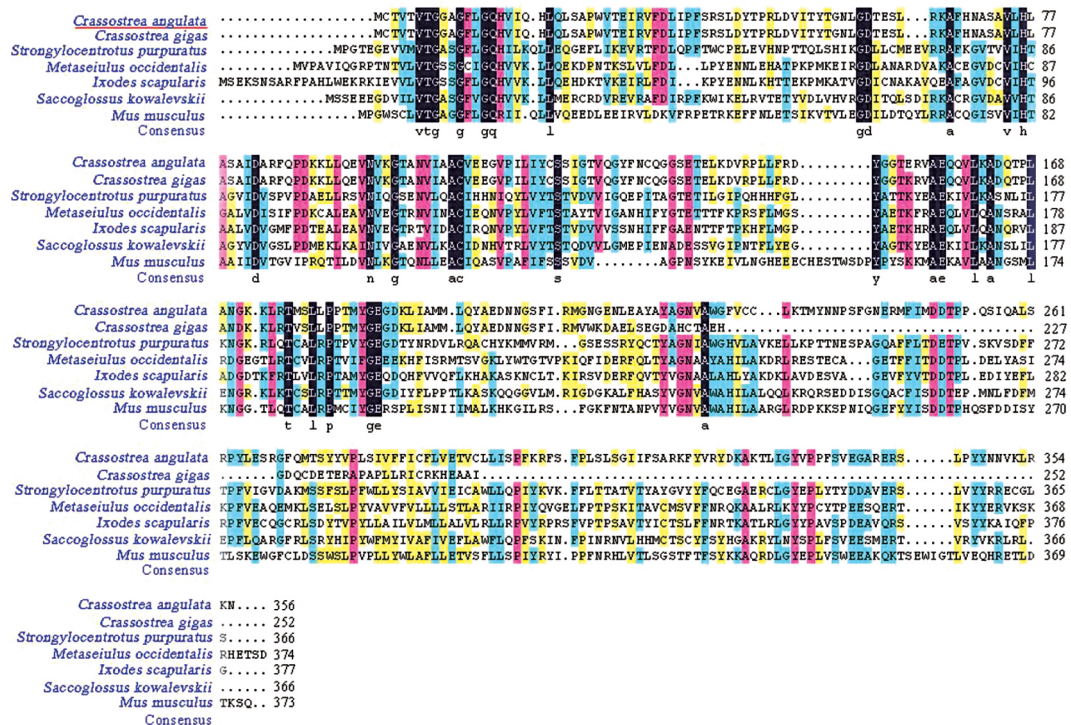
2.2 福建牡蛎 3β -HSD 基因的同源性和系统发育分析

多重序列比对的结果表明, *ca3 β -HSD* 氨基酸序列与其他动物的相似性为 $33\% \sim 99\%$, 其中与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 相似性最高 (图 2)。用 MEGA 4.0 软件以邻接法 (1 000 bootstrap replicates) 构建系统进化树分析 *ca3 β -HSD* 与其他物种的同源关系。进化树显示, 3β -HSDs 分别在脊椎动物和无脊椎动物聚为两大枝。而在无脊椎动物中, 两种牡蛎的 3β -HSDs 最先聚类, 接着再与其他无脊椎动物如节肢动物、棘皮动物和脊索动物等聚类 (图 3)。

```

1      CCGGGATCCACAGCCTACTGATGATGATGAGAAAAAAGTGAACACAGAGTGAGCGAAGTGAATGATG
76     GAGACTGATCTGAAGAGCTAAATGACAGAGAGTGTCCAGAGTGAATATTCCTGAAAGTCAAGGCTCC
151    TGACGGTGAAGGATATGTATAGTACAGGTGACGGAGGCGCTGGGTTTCGGGTACAGATGCTATCCAGCAT
      M C T V T V T G G A G F L G Q H V I Q H
226    CTTCACTGAGCGCCCATGGGTGACAGAAATAGAGTGTTCGACCTGATTCCATTCAGCAGATCTCTTGATTAC
21     L Q L S A P W V T E I R V F D L I P F S R S L D Y
301    ACACCAAGGCTGATGTAATACTTACACAGGGAACCTAGGAGATACGAACTCTGAGAAAGCTTTTATAAT
46     T P R L D V I T Y T G N L G D T E S L R K A F H N
376    GCCTCGCTGTGCTTCACTTGGCTTCAAGCAATAGATGCGAGATTTCAAGCGGACAGAACTCTACAGGAAGTG
71     A S A V L H L A S A I D A R F Q P D K K L L Q E V
451    AATGTGAAGGGACAGCTAATGTAATAGCGCATGTGTGGAGGAAGGTGTGCCATCTGATCTACTGCTGTCA
96     N V K G T A N V I A A C V E E G V P I L I Y C S S
526    ATCGGCATGTACAGGGATCTTAACTCCAGGGAGGTGAACAGAACTCAAGATGTCCGCTCATCTCTG
121    I G T V Q G Y F N C Q G G S E T E L K D V R P L L
601    TTCAGGGATTATGGGGAGCGAGGTGCTGACAGCAGGTTCTGAAGGCTGATCAAACTCATTAGCAAT
146    F R D Y G G T E R V A E Q Q V L K A D Q T P L A N
676    GGCAGAAATTAAGACGATGTCATTGTACCTTACAATGTATGGAGAGGGGACAACTGATGCCATGATG
171    G K K L R T M S L L P P T M Y G E G D K L I A M M
751    TTACAATACGCTAGGATAACAATGGCAGCTTATAAGAATGGGTAATGGAGAGAACTTGAGGCCATGCTTAT
196    L Q Y A E D N N G S F I R M G N G E N L E A Y A Y
826    GCTGGCAATGTGCTGGGCTTTGTATGTGCTGAGACCATGACAACTCAAGCTTTGGAATGAGAGA
221    A G N Y A W G F V C C L K T M Y N N P S F G N E R
901    ATGTTATCATGATGACAGCCCCACAGCTATTCAGGCCCTCAGTCGACCATATCTAGAGAGCAGGGGGTTC
246    M F I M D D T P P Q S I Q A L S R P Y L E S R G F
976    CAGATGACCTCTATTATGTGCCCCGTGCTATGCTGTTTCTGTTCTGTTAGAGAACTGTTGCTTTTG
271    Q M T S Y Y V P L S I V F F I C F L V E T V C L L
1051   ATTACCAATTAACGATTCTCTTTCTCTCAGTTTATCAGGAATATTTCTCCACAGGAAATTTACGTG
296    I S P F K R F S F P L S L S G I I F S T R K F Y V
1126   CGATATGATAAGGCAAGACCTGATTGGTACGCTCTCTCTCTGAGAGGGCGCAGAGAGAGATCCTTG
321    R Y D K A K T L I G Y V P P F S V E G A R E R S L
1201   CCGTATTATAACAGCTGAGTGTGAGGAATGATGATGATACATAACATTAGATTGAGATGATCTAC
346    P Y Y N N V K L R K N *
1276   TTTTGTATGAGGAAATTTTATGAGGGTGTAGATTTAGTGTATTGATTATATTGTTATAATTGATTGAT
1351   ATTGATATTGAATCTCTTTGATGATTATCAGACATAATTAGGGAACCACTATAGTGAATCA
1426   CTAGTGGAGGATCCGGA

```

图 1 福建牡蛎 β -HSD 基因的核苷酸序列和氨基酸序列Fig.1 The nucleotide and predicted deduced amino acid sequences of β -HSD gene from *C. angulata*图 2 福建牡蛎及其他物种 β -HSD 氨基酸序列的多重比对Fig.2 Multiple alignment of the β -HSD amino acid sequences between *C. angulata* and other published species

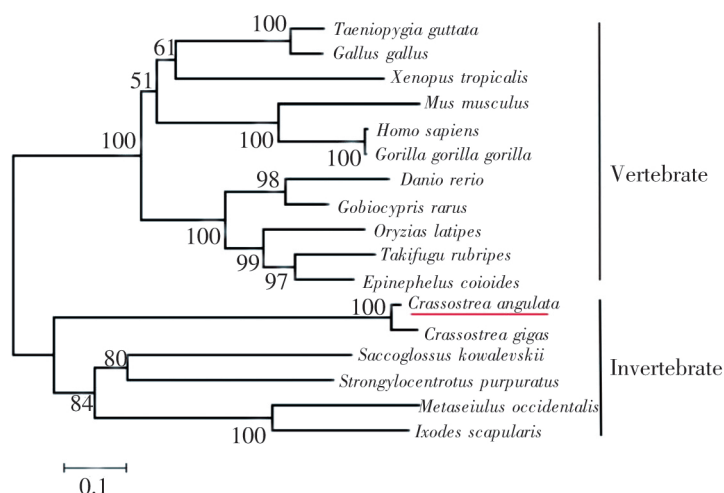
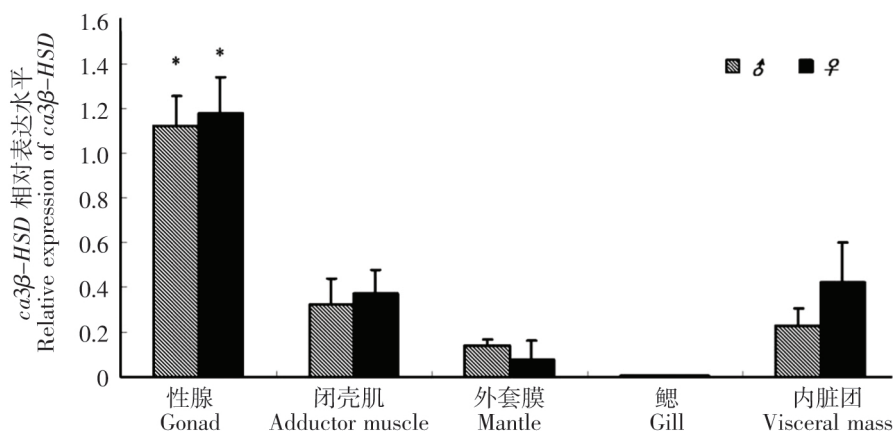
图3 3β -HSD 在福建牡蛎和其他物种间的进化树Fig.3 Phylogenetic tree of the 3β -HSD amino acid sequence between *C. angulata* and other species

图2、3中各物种 3β -HSD氨基酸序列在NCBI上的登录号如下:太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) ,EKC29143;紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) ,XP_797239;捕食螨(*Metaseiulus occidentalis*) ,XP_002434360;硬蜱(*Ixodes scapularis*) ,XP_002434360;柱头虫(*Saccoglossus kowalevskii*) ,XP_002738669;家鼠(*Mus musculus*) ,NP_694873;斑马鱼(*Danio rerio*) ,AY279108;草雀(*Taeniopygia guttata*) ,NM_001048264;红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) ,XM_003962237;非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*) ,XM_002940984;红原鸡(*Gallus gallus*) ,

NM_205118;稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*) ,JN858104;青鳉(*Oryzias latipes*) ,NM_001137565;智人(*Homo sapiens*) ,AAA51831;斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) ,FJ807731;西非低地大猩猩(*Gorilla gorilla gorilla*) ,XP_004026492。

2.3 福建牡蛎 3β -HSD基因在不同组织中的表达

如图4所示, 3β -HSD基因在福建牡蛎性腺、外套膜、闭壳肌和内脏团中均有表达,而在鳃组织中几乎没有表达,性腺中 3β -HSD基因的表达量最高,约为其他组织的2~10倍($P < 0.05$),卵巢中的表达量略高于精巢。

图4 3β -HSD 基因在福建牡蛎各组织中的表达Fig.4 3β -HSD expression in tissues of adult *C. angulata*

注: * 表示差异显著。

Notes: * was significant difference.

2.4 福建牡蛎 3β -HSD基因在生殖周期中的表达模式

图5反映了福建牡蛎生殖周期中性腺 3β -HSD基因的表达量变化。从增殖期到成熟期,

3β -HSD 基因的表达量持续增高,并在成熟期达到最大值 ($P < 0.05$),但在配子排放后,其表达量急剧下降 ($P < 0.05$)。 3β -HSD 基因的

这种表达量变化趋势在雌性个体和雄性个体中基本一致。

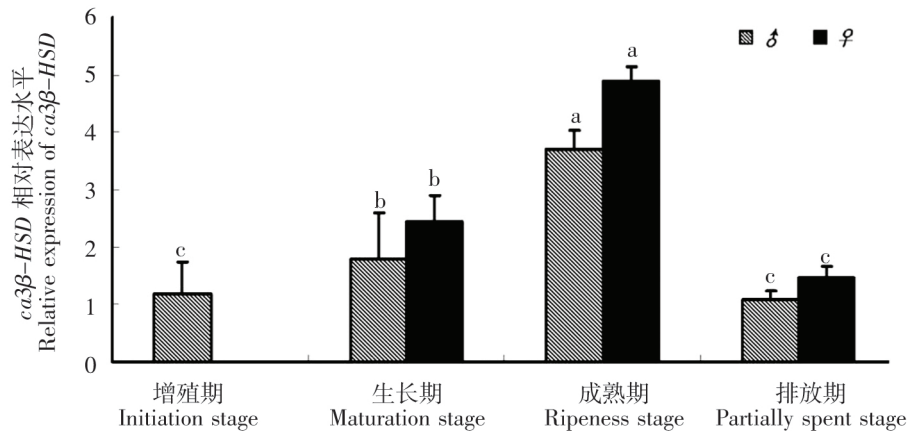


图 5 3β -HSD 基因在福建牡蛎性腺不同发育阶段的表达

Fig.5 The expression level of 3β -HSD normalized to $EF1\alpha$ in different developing stages of ovary and testis

注: 不同小写字母表示差异显著, 相同字母表示无显著差异。

Notes: Different lowercase letters indicated significant difference, otherwise the same was no significant difference.

2.5 福建牡蛎 3β -HSD 基因在卵巢中的细胞定位

原位杂交结果显示 3β -HSD 基因在福建牡蛎卵巢中呈现出细胞定位, 能与 DIG 标记的 3β -HSD 基因的反义 RNA 探针杂交, 显色后呈蓝

黑颜色的阳性信号主要分布在卵细胞周边的个体小的滤泡细胞上, 而在成熟卵细胞上没有发现有阳性信号 (图 6), 这说明 3β -HSD 基因主要表达在福建牡蛎卵巢组织的滤泡细胞中。

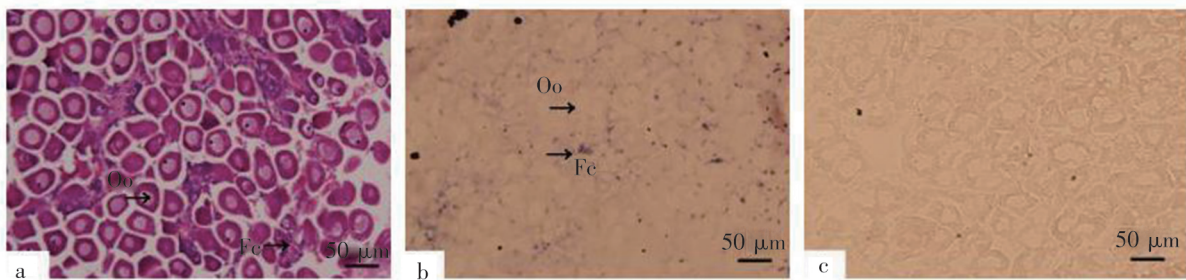


图 6 福建牡蛎 3β -HSD 基因在成熟卵巢中的分布

Fig.6 The distribution of 3β -HSD gene in mature ovary of *C. angulata*

注: a 为常规 HE 染色结果; b 为用反义探针杂交的阳性结果; c 为用正义探针杂交的阴性对照; Fc 为滤泡细胞; Oo 为卵细胞。

Notes: a was hematoxylin-eosin staining; b was antisense probe; c was sense probe; Fc was follicle cell; Oo was oocyte.

3 讨论

3β -HSD 可以通过催化 3β 位上酮基和羟基间的转化, 能分别将孕烯醇酮或脱氢表雄酮转化为有活性的孕酮和雄烯二酮。催化反应分为两步完成, 第一步为 3β 位羟基脱氢, 氧化辅酶 NAD⁺ 为

NADH; 第二步为 NADH 激活 Δ^5-3 -酮类固醇中间体构象转变为稳定的 Δ^4-3 -酮类固醇构象^[20]。脊椎动物的 3β -HSD 具有不同的亚型, 如人类 3β -HSD 具有 2 种亚型^[21], 而大鼠有 6 种亚型的 3β -HSD^[22]。不同亚型的 3β -HSD 具有不同的组织分布特点和生物学功能, 其中人类

II型 3β -HSD和大鼠I型、II型 3β -HSDs主要参与了类固醇激素的合成调节^[23]。研究者在一些无脊椎动物(如绦虫和孢子虫)的体内也检测到 3β -HSD的活性,并发现它能参与调节类固醇激素的合成,对生长和发育具有促进作用。海兔、紫贻贝、真蛸和蜗牛等软体动物的性腺组织提取物中也被证明含有能将孕烯醇酮、 17α -羟基孕烯醇酮、脱氢表雄酮催化形成孕酮的 3β -HSD活性^[9-12]。Krusch等^[9]还发现蜗牛卵巢中 3β -HSD的活性变化与生殖活动紧密联系,其在产卵前的活性显著高于排卵后。以上结果表明 3β -HSD可能同样参与了贝类中类固醇激素的合成过程。Zhang等^[24]在对太平洋牡蛎全基因组测序时获得太平洋牡蛎中两个亚型的 3β -HSDs基因序列,分别是 3β -HSD1型和 3β -HSD2型,但氨基酸比对后发现这两种亚型的 3β -HSD同源性高达96%。除此之外,国内外未见其他关于贝类 3β -HSD基因研究的报道。本实验用基因克隆的方法获得了福建牡蛎 3β -HSD基因全长序列,这是在贝类中获得的首个 3β -HSD基因全长。ca 3β -HSD氨基酸序列具有酶活性中心和辅酶结合位点等结构域,而这些都是 3β -HSD家族基因典型的结构特征。氨基酸序列比对结果显示,福建牡蛎 3β -HSD与其他物种具有较高的同源性。本次研究发现,福建牡蛎 3β -HSD基因在性腺中高量表达,这与人、大鼠、鳗鱼中I型和II型 3β -HSD基因的组织分布特征相似^[23],也与性腺是贝类重要的生殖内分泌器官是相对应的。原位杂交的结果进一步表明其主要表达在卵巢的滤泡细胞上,这与Matsumoto等^[25]、王丹等^[26]、许茜等^[27]用免疫组化的方法获得的结果一致。此外, 3β -HSD基因在福建牡蛎的生殖周期中呈现出与其他部分脊椎动物相似的表达模式^[23],并且与性类固醇激素水平的变化显著相关,这预示了 3β -HSD在福建牡蛎性类固醇激素的合成过程中可能发挥了重要作用。此外,福建牡蛎 3β -HSD基因在雌、雄个体中表达量没有明显差别,这可能是由于 3β -HSD的催化产物雄烯二酮或孕酮是雌二酮和睾酮合成共同的前体物质。

本研究通过分子生物学的方法克隆获得了福建牡蛎性类固醇激素合成酶重要基因 3β -HSD

的全长,并研究了其序列结构特征和时空表达模式,证明了该基因指导合成的 3β -羟化类固醇脱氢酶是牡蛎性类固醇激素合成过程中的关键酶,对调节牡蛎性类固醇激素的合成起着重要的作用;同时进一步证明了贝类具有合成内源性类固醇激素的能力。

参考文献:

- [1] 宁岳,郭香,曾志南,等.牡蛎育种研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2016,55(5):624-636.
- [2] Leguellec D, Thiard M, Remy-Martin J, et al. *In vitro* metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa* [J]. General Comparative Endocrinology, 1987, 66(3): 425-433.
- [3] Yan H, Li Q, Liu W, et al. Seasonal changes of oestradiol-17 beta and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) [J]. Journal of Molluscan Studies, 2011, 77(2): 116-122.
- [4] Wang C, Croll R P. Estrogen binding sites in the sea scallop: Characterization and possible involvement in reproductive regulation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 148(3): 303-313.
- [5] Wang C, Roger P C. Effects of sex steroids on *in vitro* gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. Invertebrate Reproduction and Development, 2003, 44(2-3): 89-100.
- [6] Wang C, Croll R P. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. Aquaculture, 2004, 238(1-4): 483-498.
- [7] Lafont R, Mathieu M. Steroids in aquatic invertebrates [J]. Ecotoxicology, 2007, 16(1): 109-130.
- [8] Lehoux J, Sandor T. The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates [J]. Steroids, 1970, 16(2): 141-171.
- [9] Krusch B, Schoenmakers H, Voogt P A, et al. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda) - an *in vitro* study [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1979, 64(1): 101-

- 104.
- [10] D'Aniello A , DiCosmo A , DiCristo C , et al. Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* Lam [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 1996 , 227 (3) : 782 – 788.
- [11] de Longcamp D , Lubet P , Drosowsky M. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*) [J]. General and Comparative Endocrinology , 1974 , 22 (1) : 116 – 127.
- [12] Gottfried H , Dorfman R I. Steroids of invertebrates V. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the male – phase ovotestis of the slug (*Ariolimax californicus*) [J]. General and Comparative Endocrinology , 1970 , 15 (1) : 120 – 138.
- [13] Foighil DÓ , Gaffney P M , Wilbur A E , et al. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* [J]. Marine Biology , 1998 , 131 (3) : 497 – 503.
- [14] Folmer O , Black M , Hoeh W , et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology , 1994 , 3 (5) : 294 – 299.
- [15] Fabioux C , Huveta A , Le Souchua P , et al. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock [J]. Aquaculture , 2005 , 250 (1 – 2) : 458 – 470.
- [16] Fabioux C , Pouvreau S , Le Roux F , et al. The oyster *vasa* – like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2004 , 315 (4) : 897 – 904.
- [17] Livak K J , Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods , 2001 , 25 (4) : 402 – 408.
- [18] Bustin S A , Benes V , Garson J A , et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real – time PCR experiments [J]. Clinical Chemistry , 2009 , 55 (4) : 611 – 622.
- [19] Ni J B , Zeng Z , Ke C H. Sex steroid levels and expression patterns of estrogen receptor gene in the oyster *Crassostrea angulata* during reproductive cycle [J]. Aquaculture , 2013 , 376 (11) : 105 – 116.
- [20] Thomas J L , Duax W L , Addlagatta A , et al. Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3β – hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase [J]. Journal of Biological Chemistry , 2003 , 278 (37) : 35483 – 35490.
- [21] Lachance Y , Labrie C , Leblanc G , et al. Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human beta – hydroxy – 5 – ene steroid dehydrogenase [J]. Molecular Endocrinology , 1989 , 3 (8) : 1310 – 1312.
- [22] Simard J , Couet J , Durocher F , et al. Structure and tissue – specific expression of a novel member of the rat 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5 – delta 4 isomerase (3 beta – HSD) family. The exclusive 3 beta – HSD gene expression in the skin [J]. Journal of Biological Chemistry , 1993 , 268 (8) : 19659 – 19668.
- [23] Kazeto Y , Ijiri S , Matsubara H , et al. Molecular cloning and characterization of 3beta – hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ – $\Delta 4$ isomerase cDNAs from Japanese eel ovary [J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology , 2003 , 85 (1) : 49 – 56.
- [24] Zhang G , Fang X , Guo X , et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature , 2012 , 490 (7418) : 49 – 54.
- [25] Matsumoto T , Osada M , Osawa Y , et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology , 1997 , 118 (4) : 811 – 817.
- [26] 王丹 , 李海龙 , 毕颖 , 等. 栉孔扇贝 17 β – hsd4 基因的克隆和表达分析 [J]. 水产学报 , 2013 , 37 (3) : 367 – 375.
- [27] 许茜 , 秦骥 , 柯才焕. 僧帽牡蛎 EGFR 基因的克隆及早期发育阶段的表达 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版) , 2010 , 49 (6) : 756 – 763.

Expression of 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase gene (3β – HSD) in steroid genesis mechanism in the Fujian oyster , *Crassostrea angulata*

ZENG Zhen^{1,2} , NI Jianbin² , SHI Bo² , TAN Qianglai^{1,2*}

(1. Xiamen Medical College , Xiamen 361023 , China;

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science , College of Ocean and Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen 361102 , China)

Abstract: *Crassostrea angulata* is a major commercial species for the shellfish aquaculture in southern China. To investigate the reproductive endocrinology of mollusc , we studied genes encoding enzymes involved in steroid metabolism in *C. angulata* by molecular biology technology. A full – length cDNA (1 444 bp) encoding a peptide of 356 amino acids of 3 – beta – hydroxysteroid dehydrogenase (3β – HSD) from *C. angulata* was obtained and the similarities of its deduced amino acid sequence to these of other molluscan species were analyzed. 3β – HSD mRNA transcripts was expressed in most tissues of oyster , at highest levels in gonad ($P < 0.05$) . The mRNA transcript of 3β – HSD increased from initiation stage to ripeness stages ($P < 0.05$) , and then the expression level decreased dramatically after partially spent ($P < 0.05$) . The results elucidated the potential role of 3β – HSD in the steroid genesis mechanism of *C. angulata*. Furthermore , results obtained from *in situ* hybridization indicated that 3β – HSD mRNA signals were detected in the follicle cell of ovary. Combining the results of the *in situ* hybridization and qRT – PCR , it suggested that 3β – HSD might play an important role in the regulation of gonad development basing on steroido genesis mechanism in *C. angulata*.

Key words: *Crassostrea angulata*; 3β – HSD; reproduction; endocrine.